



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift  
10 DE 40 38 563 A 1

51 Int. Cl.<sup>5</sup>:  
A 61 K 37/50  
A 61 K 37/14  
A 61 K 37/02

21 Aktenzeichen: P 40 38 563.9  
22 Anmeldetag: 4. 12. 90  
43 Offenlegungstag: 11. 6. 92

DE 40 38 563 A 1

71 Anmelder:  
Grünenthal GmbH, 5100 Aachen, DE

72 Erfinder:  
Schüttler, Achim, Dipl.-Chem. Dr., 5100 Aachen, DE;  
Flohé, Leopold, Prof. Dipl.-Biochem. Dr., 5106  
Roetgen, DE; Bühren, Volker, Dr.; Marzi, Ingo, Dr.;  
Trentz, Otmar, Prof. Dr., 6650 Homburg, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DE	37 15 662 A1
DD	2 66 504 A1
EP	03 42 620 A1
EP	02 95 826 A1
EP	02 84 105 A2
EP	02 83 244 A1
EP	01 72 577 A1
EP	1 89 182 A2

Infusionstherapie, 1990 Oct., 17(5) S.261-267;  
zitiert als Ref. aus der Datenbank MEDLINE, AN:  
91147250;  
Adv.Neurol., 1990, 52, S.177-183;  
zitiert als Ref. aus der Datenbank MEDLINE, AN:  
90372160;  
Patal.Fiziol.Eksp.Ter., 1990 Jan.-Feb., (1) S.17-19;  
zitiert als Ref. aus der Datenbank MEDLINE, AN:  
90280084;  
Patol.Fiziol.Eksp.Ter., 1989 Nov./Dec., (6) S.44-46;  
zitiert als Ref. aus der Datenbank MEDLINE, AN:  
90191859;  
Free Radic.Res.Comm., 1988, 4(4), S.209-224;  
zitiert als Ref. aus der Datenbank MEDLINE, AN:  
89153994;  
Ann.Neurol., 1987 June, 21(6) S.540-547;  
zitiert als Ref. aus der Datenbank MEDLINE,  
AN:872694.25;  
Peptides, 1982 Ma/June, 3(3), S.235-247;  
zitiert als Ref. aus der Datenbank MEDLINE, AN:  
83014519;  
JP 58-32826 A. In: Patents Abstracts of Japan, C-166,  
May 18, 1983, Vol.7/No.144;

54 Verwendung von Superoxiddismutasen zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Organversagen bei Risikopatienten mit Polytrauma

57 Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Superoxiddismutasen zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Organversagen bei Risikopatienten, insbesondere Multi-Organversagen bei Polytraumapatienten. Die Verabreichung der Superoxiddismutasen erfolgt dabei in Dosen von 1 bis 15 g täglich über einen Zeitraum von zumindest 2 Tagen nach dem initialen Trauma mittels intravenöser Infusion. Vorzugsweise wird natürliche oder rekombinante menschliche Kupfer/Zink-Superoxiddismutase eingesetzt.

DE 40 38 563 A 1

## Beschreibung

Multi-Organversagen stellt die häufigste Todesursache bei denjenigen Polytraumapatienten dar, die die ersten 24 Stunden nach der chirurgischen Primärversorgung überleben. Die Pathomechanismen, die zu dieser lebensbedrohlichen Komplikation führen, sind bisher ungeklärt. Eine gezielte Therapie oder auch Prophylaxe dieser Komplikation war daher bisher nicht möglich.

Bei einer Sepsis und dem nachfolgenden Organversagen werden die klinischen Zeichen fast ausschließlich auf das Eindringen von Mikroorganismen und die Freisetzung von Endotoxinen zurückgeführt. Dazu wurde als Erklärung vorgeschlagen, daß durch Endotoxin eine Aktivierung des Komplementsystems erfolgt, die zur Bildung von zahlreichen schädigenden Mediatoren, u. a. Sauerstoffradikalen, führt. Trotz bemerkenswerter Fortschritte in der Grundlagenforschung hinsichtlich des septischen Schocks ist aber nach wie vor unklar, welche Bedeutung den Sauerstoffradikalen neben anderen Mediatoren zukommt. Verschiedene experimentelle Untersuchungen zeigten jedoch bei Sepsismodellen eine positive Wirkung der Verabreichung von Superoxiddismutasen sowohl in bezug auf den Verlauf des Krankheitsbildes als auch bezüglich der Letalität.

Demgegenüber erwiesen sich in tierexperimentellen Traumamodellen Superoxiddismutasen weder bei der Ratte noch bei Primaten als wirksam (Circ. Shock 31, Abstract Nr. 8; 1990). Ob Sauerstoffradikale neben den übrigen Mediatoren beim Polytrauma eine wesentliche Rolle spielen, war daher offen und eher unwahrscheinlich.

Überraschenderweise wurde nun in klinischen Studien gefunden, daß nach der Verabreichung von hohen Dosen von Superoxiddismutase an Polytraumapatienten eine signifikant positive Wirkung in bezug auf die Entwicklung posttraumatischer lebensbedrohlicher Komplikationen einschließlich einfachen und multiplen Organversagens festzustellen war, wobei keine Nebenwirkungen, die auf die hohe Superoxiddismutasedosierung über mehrere Tage hätten zurückgeführt werden können, auftraten. Dieser positive Effekt mag daraus resultieren, daß die Konsequenzen der vielen Verletzungen nach einem Polytrauma als ein wiederholt auftretendes Reperfusionssyndrom (bekannt als Quelle von Sauerstoffradikalen) aufgefaßt werden können. Gegenstand der Erfindung ist daher die Verwendung von Superoxiddismutasen zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Organversagen bei Risikopatienten.

Superoxiddismutasen sind natürlich vorkommende Metalloproteine, die in der Lage sind, Superoxidradikale zu dem weniger toxischen Wasserstoffperoxid zu dismutieren. Im allgemeinen enthalten die Enzyme ein oder zwei Metallkationen wie diejenigen von Eisen, Mangan, Kupfer, Zink, Cadmium, Kobalt oder Quecksilber. Das menschliche Enzym sowie die meisten von Säugern stammenden Superoxiddismutasen enthalten eine Kombination von Kupfer- und Zinkionen. Die menschliche Kupfer-/Zink-Superoxiddismutase besteht aus zwei gleichen Untereinheiten mit je 153 Aminosäureresten, und sie enthält je Untereinheit ein Kupfer- und ein Zinkatom. Das dimere Enzym hat ein Molekulargewicht von 32 000 D. Es ist aber auch eine tetramere Kupfer-/Zink-Superoxiddismutase eukaryotischen Ursprungs mit einem Molekulargewicht von 130 000 D beschrieben worden. Eine Mangansuperoxiddismutase eukaryotischen Ursprungs ist ein Tetrameres mit einem Molekulargewicht von 80 000 D, und Eisen- und Manganformen bak-

teriellen Ursprungs sind Dimere mit Molekulargewichten von etwa 40 000 Dalton.

Bekannte Verfahren zur Gewinnung von Superoxiddismutasen gehen z. B. von Erythrozyten, Leber oder anderen Geweben aus (vgl. z. B. deutsche Patente 19 24 230 und 22 59 405 sowie deutsche Offenlegungsschrift 22 59 404 oder europäische Patentschrift 19 477). Während z. B. menschliche Superoxiddismutase N-terminal acetyliert ist, weisen Superoxiddismutasen aus einer Anzahl anderer natürlicher Vorkommen dieses Merkmal nicht auf.

Alternativ können Superoxiddismutasen auch aus kultivierten transformierten Zelllinien gewonnen werden, wie dies beispielsweise in der internationalen Patentanmeldung WO 87/01 387 beschrieben wurde.

Die Herstellung von Superoxiddismutasen aus transformierten Bakterien oder Hefen wurde beispielsweise in der DE-OS 36 39 725 oder in der europäischen Patentschrift 180 964 beschrieben. Schließlich seien noch die Verfahren zur Gewinnung von Superoxiddismutasen mit Hilfe der rekombinanten DNA-Technologie in Hefen erwähnt, die beispielsweise in der europäischen Patentanmeldung 138 111 sowie in der europäischen Patentanmeldung 213 628 beschrieben wurden. Bei dem Verfahren der europäischen Patentanmeldung 138 111 wird menschliche Superoxiddismutase in der N-terminal acetylierten Form erhalten.

Eine nach den Angaben der europäischen Patentanmeldung 01 38 111 in transformierten Hefezellen gewonnene Kupfer-/Zink-Superoxiddismutase, die bei den weiter unten beschriebenen klinischen Untersuchungen eingesetzt wurde, zeigte eine minimale spezifische Aktivität von 3000 Einheiten/mg (bestimmt entsprechend J. Biol. Chem. 244, Seiten 6049 bis 6055; 1969). Ihre Aminosäuresequenz ist identisch mit der von Kupfer-/Zink-Superoxiddismutase natürlichen menschlichen Ursprungs, die z. B. in Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, Seiten 675 bis 690; 1983) beschrieben wurde.

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung von Superoxiddismutasen zur Prophylaxe oder Behandlung von Organversagen bei Risikopatienten wird im allgemeinen die Superoxiddismutase dem Patienten durch intravenöse Infusion in einer Dosierung verabreicht, die konstante und ausreichend hohe Plasmaspiegel während mehrerer Tage gewährleistet. Dabei sollte die Dosierung zwischen etwa 1 g und etwa 15 g pro Tag liegen. Man erzielt damit Plasmaspiegel zwischen 30 000 und 1 000 000 Einheiten Superoxiddismutase pro Liter Plasma. Eine geeignete Form für die Infusionstherapie ist insbesondere eine durch Gefriertrocknung erhaltene sterile pyrogenfreie Superoxiddismutasezubereitung.

Die Dauer der Infusionstherapie ist abhängig von dem speziellen Krankheitsbild und dem Allgemeinzustand des Patienten. Sie liegt im Ermessen des behandelnden Arztes, wobei aber im allgemeinen die Applikation für mindestens 2 Tage erfolgen soll und für einen Zeitraum für bis zu 10 Tagen durchgeführt werden kann.

Die überraschende signifikante Verbesserung in bezug auf die Entwicklung posttraumatischer lebensbedrohlicher Komplikationen einschließlich der Vermeidung eines Organversagens bei Polytraumapatienten konnte mit den im folgenden beschriebenen klinischen Studien gezeigt werden:

24 Patienten wurden in einer randomisierten, placebo-kontrollierten Doppel-Blind-Studie in parallele Gruppen aufgenommen. Die Einschlusskriterien waren:

– Polytraumapatienten (älter als 18 Jahre) mit einem Schweregrad nach "Injury Severity Score (ISS)" (vgl. Greenspan et al., J. Trauma 25 (1985) 60 bis 64) von – 27

– Therapiebeginn nicht später als 48 Stunden nach dem initialen Trauma.

Die Patienten hatten bei Verkehrs- oder Betriebsunfällen multiple Frakturen und Weichteilverletzungen erlitten. Ausgeschlossen von der Studie wurden Patienten, bei denen ein Schädel-Hirn-Trauma im Vordergrund der Verletzungen stand.

Die Infusionstherapie wurde sobald wie möglich nach der chirurgischen Primärversorgung begonnen. Es wurden 3 g der rekombinanten Superoxiddismutase pro Tag für einen Zeitraum von 5 Tagen verabreicht. Der gesamte Beobachtungszeitraum betrug 14 Tage, während dessen kontinuierlich klinische und biochemische Parameter erhoben wurden. Diese Erhebung von Parametern richtete sich wesentlich nach ihrer Notwendigkeit für die Analyse mittels des in der Literatur beschriebenen "multiple-organe-failure-score (MOF-Scores)" nach Goris et al. (Arch. Surg. 120, Seiten 1109 bis 1115; 1985). Zusätzlich wurden biochemische Parameter erhoben, die zur weiteren Aufklärung der zugrundeliegenden Pathomechanismen des posttraumatischen Organversagens von Bedeutung sein können, wie z. B. Elastase-plasmaspiegel. Wie sich aus einer Arbeit in Deutschem Ärzteblatt 87, Seiten 952 bis 956 (1990) ergibt, korrelieren die Plasmaspiegel der Granulozyten-Elastase mit der Inzidenz posttraumatischer Komplikationen bei Polytraumapatienten. Ein Elastasespiegel von 85 µg/l am 5. Tag nach dem Trauma stellt danach eine Diskriminierungsgrenze dar, oberhalb deren eine hohe Inzidenz von Komplikationen einschließlich Organversagen vorliegt.

Bei der durchgeführten klinischen Studie betrugen die Elastasespiegel am 5. Tag nach dem Trauma (also an Tag 6 der Studie) für die mit Superoxiddismutase behandelte Patientengruppe  $57,9 \pm 5,7$  µg/l, während sie für die Placebogruppe  $112 \pm 23,7$  µg/l betrugen. Die Anzahl der Patienten mit Elastasespiegeln oberhalb und unterhalb des Diskriminierungspunktes von 85 µg/l sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt ("SOD" = Superoxiddismutase).

Elastasespiegel am Tag 1

	< 85 µg/l	> 85 µg/l
SOD	1	11
Placebo	2	10

Elastasespiegel am Tag 6

	< 85 µg/l	> 85 µg/l
SOD	11	1*)
Placebo	5	7

\*) Patient mit Elastasespiegel von 86 µg/l

Ein ähnlicher Unterschied wurde auch für das Akutphase-Protein CRP (C-reaktives Protein) mit  $104 \pm 16$  mg/ml in der mit Superoxiddismutase behan-

delten Patientengruppe gegenüber  $160 \pm 19$  mg/ml in der Placebogruppe gefunden.

Der allgemeine klinische Eindruck bezüglich der Schwere der posttraumatischen Komplikationen läßt sich mittels des bereits erwähnten MOF-Scores nach Goris et al. darstellen. Die Auswertung der MOF-Scores zeigt deutlich eine signifikant bessere Organfunktion bei den mit Superoxiddismutase behandelten Patienten im Vergleich zu denen der Placebogruppe, wie sich aus der beigefügten Abbildung ergibt, in der niedrigere Score-Werte eine bessere Organfunktion anzeigen. Die Auswertung der MOF-Scores ergibt also ein ähnliches Bild wie die der Labordaten, d. h. daß unter der Behandlung mit Superoxiddismutase bei Polytraumapatienten eine signifikant positive Wirkung in Bezug auf die Entwicklung posttraumatischer Komplikationen beobachtet und nachgewiesen werden konnte.

#### Patentansprüche

1. Verwendung von Superoxiddismutasen zur Prophylaxe und/oder Behandlung eines Organversagens bei Risikopatienten mit Polytrauma.
2. Verwendung von Superoxiddismutasen gemäß Anspruch 1 in Dosen von 1 bis 15 g, vorzugsweise 2 bis 8 g pro Tag pro Patient zur Behandlung von Polytraumapatienten.
3. Verwendung von Superoxiddismutasen gemäß Ansprüchen 1 und 2 für einen Zeitraum von 2 bis 10 Tagen nach dem initialen Trauma.
4. Verwendung von Superoxiddismutasen gemäß Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Superoxiddismutase mittels intravenöser Infusion appliziert wird.
5. Verwendung einer Superoxiddismutase gemäß Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß natürliche oder rekombinante menschliche Kupfer/Zink-Superoxiddismutase zur Anwendung gelangt.
6. Verfahren zur Verhinderung und/oder Behandlung eines Organversagens bei Risikopatienten mit Polytrauma, dadurch gekennzeichnet, daß als Therapeutikum eine Superoxiddismutase parenteral infundiert wird.
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Superoxiddismutase in zur Erzeugung von Plasmaspiegeln zwischen 30 000 und 1 000 000 Einheiten Superoxiddismutase pro Liter Plasma hinreichenden Dosierungen appliziert wird.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

MOF-Score

